

## Application of a Dermal Equivalent to Organ Culture of Human Scalp Hair Follicle

Bo-Young Yoo<sup>1</sup>, Doo-Hoon Lee<sup>1</sup>, Young-Kwon Seo<sup>1</sup>, Youn-Ho Shin<sup>1</sup>, Key-Yong Song<sup>2</sup>,

Seong-Jun Seo<sup>3</sup>, Sung-Joo Whang<sup>4</sup>, Young-Jin Kim<sup>5</sup>, Eun-Kyung Yang<sup>6</sup>,

Chang-Seo Park<sup>7</sup>, Ih-Seop Chang<sup>8</sup>, and Jung-Keug Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

<sup>2</sup>Department of Pathology, Chung-Ang University, Seoul 140-757, Korea

<sup>3</sup>Department of Dermatology, Chung-Ang University, Seoul 140-757, Korea

<sup>4</sup>Hair Clinic Center, CNP Cha and Park Hospital, Seoul 135-893, Korea

<sup>5</sup>Biomedical Research Center, Lifecord. Co., Suwon 442-749, Korea

<sup>6</sup>R&D Center, Bioland. Ltd., Chun-An 330-863, Korea

<sup>7</sup>Biotech Research Lab., Doosan. Ltd., Kyonggi-Do 449-844, Korea

<sup>8</sup>R&D Center, Amore Pacific. Ltd., Kyonggi-Do 449-729, Korea

TEL : +82-2-2260-3365 FAX : 82-2-2271-3489

### Abstract

The recent development of methods for culturing hair follicles in vitro has proved an important tool to investigate many aspects of drug screening. Human hair follicle is composed of multiple types of cells, whose interactions regulate morphology and cycling-anagen, catagen, and telogen. Many investigators have tried to develop models to prolong of the period of hair elongation in vitro. However these are limited in submerged culture, which don't work due to the lack of cell-cell interactions which are abundant in vivo environment. So we applied dermal equivalent (DE) to culturing hair follicles to prolong hair growth period.

### 서 론

모낭은 dermal sheath (DS), outer root sheath (ORS), inner root sheath (IRS), dermal papilla (DP), germinative epithelial cell (GE), melanocyte 등 여러 종류의 세포로 구성되어 있으며 여러 가지 세포간의 상호작용에 의해 세포의 주기나 모발 성장이 조절된다. 모낭의 복잡한 구조와 이의 조절 기작에 대하여 보다 깊이 이

해하려면 재현성이 있고 정량적 관찰이 가능하며 각종 인자를 인위적으로 조절할 수 있는 *in vitro* 모델 시스템이 반드시 요구되며 신약개발관점에서도 후보약물 선별에도 중요성이 부각되고 있다. 그러나 현재의 *in vitro* 모델은 액침배양 수준에 머무르고 있다.<sup>1)</sup> 본 연구는 *in vivo* 와 보다 유사한 환경을 조성하기 위해 두피에 존재하는 DP cell 과 두피의 fibroblast를 분리하여 dermal equivalent를 제조하여 기관배양에 이용하였다.

### 재료 및 방법

모낭은 비교적 남성호르몬의 영향을 받지 않는 후두부에서 분리한 모낭으로 모발이식수술시 식모기 장착이 어려운 모낭을 기증받아 사용하였다. Hair shaft의 길이 성장과 외측모근초의 길이 성장을 동시에 확인하기 위해 ORS 이상 자라나온 shaft를 제거한 후 이용하였다. Fibroblast는 모낭을 분리하고 남은 두피를 dispase로 4°C에서 16 시간 처리 후 0.05% trypsin / 0.02% EDTA로 5분간 처리하여 분리했다.

Dermal equivalent (DE)는 fibroblast를 collagen solution에 섞어 300  $\mu$ l/ insert 분주하였으며 제조된 DE는 6 well plate에서 배양되었으며 배지는 DMEM/ 10% FBS 로 1주일간 배양 후<sup>5)</sup> 기관배양용 배지로 전환하여 모낭과 co-culture하였다. Collagen solution은 0.5% collagen, 5 $\times$  DMEM, buffer를 7 : 2 : 1로 섞어 제조하였다. 기관배양용 배지는 Williams' E media 에 0.2% ITS (최종농도: insulin 10  $\mu$ g/ml, transferrin 10  $\mu$ g/ml, sodium selenite 10 ng/ml)와 10 ng/ml hydrocortisone를 첨가하였다.<sup>1</sup> *In vitro* model로서의 적합성여부를 확인하기 위해 DE에 minoxidil를 첨가하여 영향을 보고자 했다.<sup>2),3)</sup> 형태학적인 분석을 위해 세포질과 세포핵을 확인하는 Hematoxylin and Eosin (H&E)과 세포의 apoptosis를 확인하는 TUNEL 검사를 수행하였다.

### 결과 및 고찰

세포가 없는 경우와 비교했을 때 DP나 dermal fibroblast(DFb)가 있는 것이 길이 성장과 morphology면에서 우수한 결과를 나타냈으며 DP cell과 DFb를 비교하면 DFb가 모낭의 길이 성장에 더 좋은 영향을 주는 것으로 나타났다.(Fig.1) 세포농도 면에서는  $1 \times 10^5$  cells/ml 의 농도로 접종한 것이  $2 \times 10^5$  cells/ml보다 좋은 결과가 나타났다.(Fig.2) 조직검사 결과 최종 모델에 minoxidil을 첨가한 결과 모구가

control에 비해 크게 유지되는 것으로 나타났다. 액침배양에서는 확인할 수 없던<sup>4)</sup> minoxidil의 영향을 확인할 수 있었으며 in vivo와 유사하게 작용했음을 확인할 수 있었으며 보다 진보된 in vitro hair growth model임을 확인할 수 있었다.

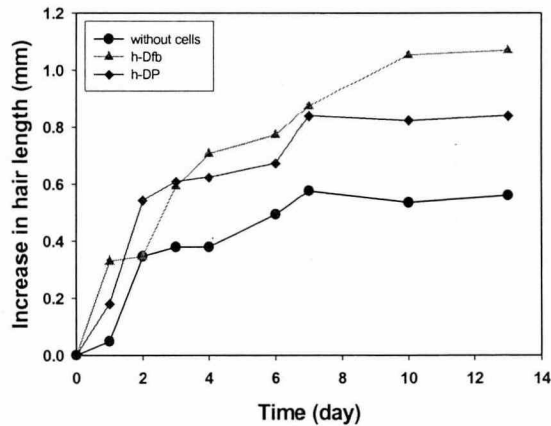


Figure 1. Effects of cell types which inoculated in DE on hair growth of organ cultured scalp hair follicles on the DE.

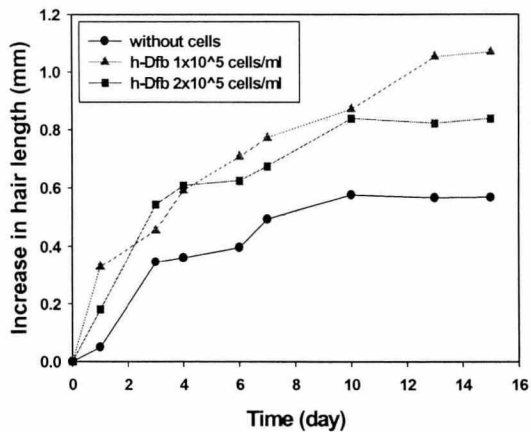


Figure 2. Effects of dermal fibroblast density of DE on hair growth of organ cultured scalp hair follicles on the DE.

### 요 약

본 연구는 in vivo와 유사한 환경을 조성하여 기존의 기관 배양기간인 7일보다

연장하려는 연구이며 세포가 있는 경우 세포가 없는 경우보다 morphology나 길이 성장 면에서도 모두 우수한 결과를 나타냈으며 minoxidil 첨가실험을 통해 DE를 이용한 모델이 단순 액침배양보다 한 단계 진보된 hair growth model임을 확인할 수 있었다.

## References

1. G. E. Westgate, W. T. Gibson, T. Kealey, M. P. Philpott (1993), Prolonged maintenance of human hair follicles in vitro in as a serum free medium, *British Journal of Dermatology* **129**, 372-379.
2. Otomo S. (2002), Hair growth effect of minoxidil, *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **119**(3), 167-174.
3. Buhl A. E, Waldon D. J, Kawabe T. T, Holland J. M. (1989), Minoxidil stimulates mouse vibrissae follicles in organ culture, *Journal of Investment Dermatology* **92**(3), 315-320.
4. Tae Gyun Lim, Jeong Hun Park, Gwang Seong Choi (2003), Original article : Effects of TNF- $\alpha$  and minoxidil on human hair growth in vitro, *Korean Journal of Dermatology* **41**(4), 445-450.
5. Eun Kyung Yang, Young Kwon Seo, Hee Hun Youn, Doo Hoon Lee, Sue Nie Park, Jung Keug Park (2000), Tissue engineered artificial skin composed of dermis and epidermis, *Artificial Organ*. **24**(1), 7-17.